

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-211379

(43)Date of publication of application : 03.08.1992

(51)Int.Cl.

C12N 15/55
 C12N 1/21
 C12P 13/02
 //(C12N 15/55
 C12R 1:01)
 (C12N 1/21
 C12R 1:19)
 (C12P 13/02
 C12R 1:19)

(21)Application number : 03-033236

(71)Applicant : BEPPU TERUHIKO
YAMADA HIDEAKI

(22)Date of filing : 27.02.1991

(72)Inventor : BEPPU TERUHIKO
YAMADA HIDEAKI
NISHIYAMA MAKOTO
NAGASAWA TORU
HORINOUCI SUEJI

(30)Priority

Priority number : 02 48078 Priority date : 28.02.1990 Priority country : JP

(54) GENE DNA CODING POLYPEPTIDE HAVING NITRILE HYDRATASE ACTIVITY AND TRANSFORMANT CONTAINING THE SAME

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide the title novel DNA to be used for building transformant capable of producing polypeptide having nitrile hydratase activity even for aromatic nitrile hydration.

CONSTITUTION: The objective gene DNA having (A) subunit α (H) having amino acid sequence of formula I and (B) subunit β (H) having amino acid sequence of formula II and coding polypeptide having nitrile hydratase activity. The present DNA(H) can be isolated from Rhodococcus rhodochrous J-1 (FERM P-1478).

Genetic engineering techniques are used to construct a recombinant DNA molecule containing the gene for the nitrile hydratase enzyme. The recombinant DNA is then introduced into a host cell, such as Escherichia coli, and the host cell is grown in a medium containing a nitrile substrate. The host cell produces the nitrile hydratase enzyme, which is then purified and used for the hydration of nitriles.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application converted

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-211379

(43) 公開日 平成4年(1992) 8月3日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/55	Z N A	7236-4 B		
1/21		6977-4 B		
C 1 2 P 13/02				
// (C 1 2 N 15/55		8828-4 B	C 1 2 N 15/00	A
			審査請求 未請求 請求項の数 9 (全 20 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平3-33236	(71) 出願人	591038107 別府 輝彦 東京都杉並区堀之内 1 丁目 5 番 21 号
(22) 出願日	平成 3 年 (1991) 2 月 27 日	(71) 出願人	591038118 山田 秀明 京都府京都市左京区松ヶ崎木ノ本町 19 番地の 1
(31) 優先権主張番号	特願平2-48078	(72) 発明者	別府 輝彦 東京都杉並区堀之内 1 丁目 5 番 21 号
(32) 優先日	平 2 (1990) 2 月 28 日	(72) 発明者	山田 秀明 京都府京都市左京区松ヶ崎木ノ本町 19 番地の 1
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	弁理士 平木 祐輔 (外 2 名) 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ニトリルヒドラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子 D
NA、これを含有する形質転換体

(57) 【要約】

【構成】 サブユニット $\alpha^{(H)}$ 、サブユニット $\beta^{(H)}$ のアミノ酸配列を有しニトリルヒドラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子 DNA^(H)。サブユニット $\alpha^{(L)}$ 、サブユニット $\beta^{(L)}$ のアミノ酸配列を有しニトリルヒドラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子 DNA^(L)。

【効果】 このニトリルヒドラーゼ遺伝子を菌体内に多コピー存在させ、菌体内酵素量を従来に比して飛躍的に増大させることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1のサブユニット $\alpha^{(H)}$ 及び配列番号2のサブユニット $\beta^{(H)}$ のアミノ酸配列を有しニトリルヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子DNA^(H)。

【請求項2】 配列番号3のサブユニット $\alpha^{(L)}$ 及び配列番号4のサブユニット $\beta^{(L)}$ のアミノ酸配列を有しニトリルヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子DNA^(L)。

【請求項3】 サブユニット $\alpha^{(H)}$ 及びサブユニット $\beta^{(H)}$ が配列番号5及び配列番号6のDNA配列を有するものである請求項1記載の遺伝子DNA^(H)。

【請求項4】 サブユニット $\alpha^{(L)}$ 及びサブユニット $\beta^{(L)}$ が配列番号7及び配列番号8のDNA配列を有する請求項2記載の遺伝子DNA^(L)。

【請求項5】 請求項1～4記載のH遺伝子DNA又はL遺伝子DNAをベクターに組み込んだ組換え体DNA。

【請求項6】 請求項5記載の組換え体DNAで形質転換された形質転換体。

【請求項7】 請求項6記載の形質転換体を培地に培養し、培養物からニトリルヒドラターゼを採取することを特徴とするニトリルヒドラターゼの製造法。

【請求項8】 請求項6記載の形質転換体を培地に培養し、得られるニトリルヒドラターゼの作用によりニトリル類を対応するアミド類に転換するアミド類の製造法。

【請求項9】 請求項6記載の形質転換体を培養し、得られる形質転換体の培養液、分離菌体、菌体処理物又はこれらの固定化物をニトリル類に作用させ対応するアミド類を製造することを特徴とするアミド類の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はロドコッカス ロドクロウス(Rhodo- coccus rhodochrous) J-1株に由来し、ニトリル類を対応するアミド類に変換する能力を有するニトリルヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子DNA、このDNAを含む組換え体DNA及び該組換え体DNAにより形質転換された形質転換体に関する。

【0002】

【従来の技術】ニトリル類を水和して相当するアミド類を生成させる酵素はニトリラーゼまたはニトリルヒドラターゼとして知られており、該酵素を産生する微生物として、例えばバチルス属、バクテリジウム属、マイクロコカス属及びプレビバクテリウム属(特公昭62-21519号公報参照)、コリネバクテリウム属及びノカルジア属(特公昭56-17918号公報参照)、シュードモナス属(特公昭59-37951号公報参照)及びロドコッカス属、アルソロバクター属及びミクロバクテリウム属(特開昭61-192193号公報参照)、及びロドコッカス。ロドクロウス

(特開平2-470号公報参照)等の微生物を挙げることができる。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】遺伝子組換えの方法でクローン化されたニトリルヒドラターゼ遺伝子によるニトリル類の水和では、菌体内に同遺伝子を多コピー存在させることができるため、微生物の触媒能力を従来の方法に比して飛躍的に増大させることが期待できる。

【0004】この遺伝子組換え方法に関し、ロドコッカス sp. N-774株(微工研条寄第1936号)に由来し、ニトリル類を対応するアミド類に変換する能力、すなわちニトリルヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子DNAに係る発明が先に本発明者の一人らによって提案されている(特願昭63-202779号)。本発明は、さらに芳香族ニトリル類の水和に対しても極めて高いニトリルヒドラターゼ活性を有するロドコッカス ロドクロウス J-1株前記特開平2-470号公報記載からニトリルヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAを取り出し、これをベクターに組み込んで組換え体DNAとし、さらに微生物に形質転換し形質転換体を得て、本発明を完成するに至った。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明は、

1. 配列番号1のサブユニット $\alpha^{(H)}$ 及び配列番号2のサブユニット $\beta^{(H)}$ のアミノ酸配列を有しニトリルヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子DNA^(H)、
2. 配列番号3のサブユニット $\alpha^{(L)}$ 及び配列番号4のサブユニット $\beta^{(L)}$ のアミノ酸配列を有しニトリルヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子DNA^(L)、
3. サブユニット $\alpha^{(H)}$ 及びサブユニット $\beta^{(H)}$ が配列番号5及び配列番号6のDNA配列を有するものである上記1記載の遺伝子DNA^(H)、
4. サブユニット $\alpha^{(L)}$ 及びサブユニット $\beta^{(L)}$ が配列番号7及び配列番号8のDNA配列を有する上記2記載の遺伝子DNA^(L)、
5. 上記1～4記載のH遺伝子DNA又はL遺伝子DNAをベクターに組み込んだ組換え体DNA、
6. 上記5記載の組換え体DNAで形質転換された形質転換体、
7. 上記6記載の形質転換体を培地に培養し、培養物からニトリルヒドラターゼを採取することを特徴とするニトリルヒドラターゼの製造法、
8. 上記6記載の形質転換体を培地に培養し、得られるニトリルヒドラターゼの作用によりニトリル類を対応するアミド類に転換するアミド類の製造法、
9. 上記6記載の形質転換体を培養し、得られる形質転換体の培養液、分離菌体、菌体処理物又はこれらの固定化物をニトリル類に作用させ対応するアミド類を製造す

3

ることを特徴とするアミド類の製造法、に関する。

【0006】以下に本発明を詳細に説明する。本発明は、下記(1)～(8)の工程により実施されるものである。

(1) ニトリルヒドラーゼの抽出精製とアミノ酸配列の部分的決定：

培養集菌したロドコッカス ロドクロウス J-1 (微工研条寄第1478号)株からその中に含有される2種類のニトリルヒドラーゼ (H酵素とL酵素と呼称する。)を抽出精製し、それぞれの酵素をさらに高速液体クロマトグラフィーを用いて各2つのサブユニット (α 、 β) に分離する。そして、これらのサブユニットのN末端のアミノ酸配列の一部を決定する。各アミノ酸配列は配列番号9～12に示す通りである。

(2) ニトリルヒドラーゼのDNAプローブの作製：本発明においては、前記特願昭63-202779号明細書記載のロドコッカス sp. N-774株のニトリルヒドラーゼの β サブユニットのアミノ酸配列が上記各 β サブユニットと高い相同性を示したことより、同明細書記載の形質転換体JM105/pYUK121 (微工研条寄第1937号)を用いて、DNAプローブの作製を行った。すなわち、培養集菌したpYUK121を含有する形質転換体からpYUK121を抽出し、その中に含まれるロドコッカス sp. N-774株由来のニトリルヒドラーゼ遺伝子 (配列番号13)を含むDNA断片を制限酵素SphI及びSalIで切断後抽出精製し、これを放射性同位元素でラベルし、プローブを作製する。

(3) ニトリルヒドラーゼ染色体DNAを含むDNA断片の調製：

ロドコッカス ロドクロウス J-1株から染色体DNAを分離し、これを制限酵素で切断後、サザンハイブリダイゼーション法 [Southern, E.M., J. Mol. Biol. 98, 503 (1975)、以下同様] により目的遺伝子を含有するDNA断片を上記(2)のプローブを用いて検出する。

【0007】この工程で、プローブとハイブリダイズする鎖長の異なる2種類のDNA断片が選別される。

(4) 染色体DNA断片のベクターへの挿入：工程(3)で調製した染色体DNA断片をそれぞれベクターに挿入し、組換え体DNAのライブラリーを作製する。

(5) 形質転換体の作製及び組換え体DNAの選別：工程(4)で調製した組換え体DNAライブラリーによる形質転換体を作製し、その中から工程(2)で作製したプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーション法 [R. Bruce Wallace, et al., Nuc. Ac. Res. 9, 879 (1981)、以下同様] により目的の組換え体DNAを含む形質転換体を選別する。更にサザンハイブリダイゼーションにより、目的組換え体DNAの再確認を行う。

【0008】選別された目的のプラスミドを各々 pNHJ10H及び pNHJ20Lと称する。

(6) 組換え体DNAの精製と制限酵素地図の作成：

3

4

工程(5)で得られた pNHJ10H及び pNHJ20Lを精製した後それを用いて制限酵素地図 (図1) を作成し、目的遺伝子の含まれている箇所を決定する。

(7) 塩基配列の決定：

工程(5)で得られた pNHJ10H及び pNHJ20Lの親株由来の染色体DNA断片から不要部分を制限酵素を用いて除去し、得られたDNA断片の全塩基配列 (配列番号14、15) を決定し、工程(1)で決定したアミノ酸配列から予想される塩基配列を含むことを再確認する。

10

(8) 形質転換体を用いたニトリルヒドラーゼの生産とニトリル類のアミド類への変換：

工程(5)で作製した形質転換体を培養し、得られたニトリルヒドラーゼ酵素を含む菌体をニトリル類を含む基質溶液と混合し、アミド類を生成させる。

【0009】なお、ロドコッカス ロドクロウス J-1株は微工研に微工研条寄第1478号 (FERM BP-1478)として、及び工程(5)で作製した pNHJ10Hを含有する形質転換体TG1/pNHJ10Hは微工研に微工研条寄第2777号 (FERM BP-2777)としてまた同じく工程(5)で作製したpNHJ20Lを含有する形質転換体TG1/pNHJ20Lは微工研に微工研条寄第2778号 (FERM BP-2778)として寄託されている。

20

【0010】また、上記工程で用いるベクターとしてはプラスミドベクター (例えば pAT153, pMP9, pHG624, pKC7等)、ファージベクター (例えば λ gt11 (東洋紡績社製)、Charon 4A (Amersham社製)等)のいずれもが用いられる。また、上記工程で用いられる制限酵素としては、SphI, SalI, EcoRI, BamHI, SacI等であり、これらはいずれも市販 (宝酒造社製) されているものが用いられる。また、形質転換に用いる宿主生物としては E. coli JM105株あるいは E. coli TG1株が挙げられるが、特にこれらに限定されるものではなく、他の宿主生物を用いることができる。

30

【0011】形質転換体の培養に用いる培地は通常の培地が用いられる。ニトリル類のアミドへの変換には、上記形質転換体の培養により得られるニトリルヒドラーゼの他に形質転換体の培養液、分離菌体、菌体処理物、粗酵素液が用いられる。また、本発明で対象とするニトリルとしては、例えば、前記特開平2-470号公報記載の芳香環を形成する炭素数が4～10の芳香族ニトリルおよび炭素数2～6の脂肪族ニトリルであり、具体的には、例えば4-、3-および2-シアノピリジン、ベンゾニトリル、2,6-ジフルオロベンゾニトリル、2-チオフェンカルボニトリル、2-フロニトリル、シアノピラジン、アクリロニトリル、メタクリロニトリル、クロトニトリル、アセトニトリルおよび3-ヒドロキシプロピオニトリルなどを挙げることができる。

【0012】以下、実施例により詳細に説明する。但し、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。なお、実施例において下記の略語を用いた。

50

TE: Tris-HCl (10mM, pH7.8), EDTA (1mM, pH8.0)

TNE: Tris-HCl (50mM, pH8.0), EDTA (1mM, pH8.0), NaCl (50mM)

STE: Tris-HCl (50mM, pH8.0), EDTA (5mM, pH8.0), Sucrose (35mM)

2xYT 培地: 1.6%トリプトン、1.0%酵母エキス、0.5%NaCl

【0013】

【実施例】

(1) ニトリルヒドラターゼの抽出精製とアミノ酸配列の部分的決定:

ロドコッカス ロドクロウス J-1株を培地 (酵母エキス 3g/L, KH_2PO_4 0.5g/L, K_2HPO_4 0.5g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/L, CoCl_2 0.01g/L, クロトンアミド 3g/L, pH7.2) に28℃で80時間培養した後、集菌し、この細胞 (50g) を破碎し、硫酸分画し、透析後遠心して上清みを取り、DEAE・セルロファインクロマトグラフィー、フェニル・セファロースクロマトグラフィー、セファデックスG-150 クロマトグラフィー、オクチル・セファロース・クロマトグラフィーにかけ、2種類の活性画分を得て、これを透析して酵素液を得た。そして、この酵素液をそれぞれ高速液体クロマトグラフィーで逆相カラム (Senshu Pak VP-304-1251) [(株) センシュウ科学製] を用いて二つのサブユニット (α , β) に分離した。このサブユニットのN末端からのアミノ酸配列 ($\alpha_1^{(E)}$, $\beta_1^{(E)}$, $\alpha_1^{(L)}$, $\beta_1^{(L)}$) をアミノ酸シーケンサー [アプライドバイオシステム社製 470A] を用いて決定した。

【0014】このアミノ酸配列の結果は配列番号9~12に示す通りである。

(2) ニトリルヒドラターゼのDNAプローブの作製:

pYUK121 を含有するE. coli JM105株 (微工研条寄第1937号) を2xYT (50μg/ml アンピシリン含有) 培地 100ml で30℃で一晩 (12時間) 培養後、集菌し、TNEを加え再度集菌し、STEを8ml、リゾチームを10mg加え、0℃で5分間反応させ、0.25M EDTA 4ml加えて、更に室温で10% SDS 2ml, 5M NaCl 5mlを加え、0~4℃で3時間放置した。それを超遠心し、その上澄みに30%のPEG6000を1/2当量加え、0~4℃で一晩 (12時間) 放置し、再度遠心した後TNEに溶解して7.5mlとし、CsClを加えて遠心して除蛋白後、臭化エチジウム溶液を300~500mg/ml加えシールチューブに移し、熱シールし超遠心した。そして、ベリスタポンプでcccDNAを取り出し水飽和イソプロピルアルコールを等量以上加えて臭化エチジウムを除き、TEで透析し、精製したプラスミドpYUK121 約3mlを得た。

【0015】このpYUK121を制限酵素 Sph I と Sal I で切断し、作製したロドコッカス sp. N-774 株由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子を含む2.07kbのDNA断片を抽出精製した。そして、このDNA断片を³²Pで放射能ラベルし、プローブを作製した。なお、このプローブの塩

基配列は配列番号13に示す通りである。

(3) ニトリルヒドラターゼ染色体DNAを含むDNA断片の調製:

ロドコッカス ロドクロウス J-1株を培地 (グルコース10g/L, KH_2PO_4 0.5g/L, K_2HPO_4 0.5g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/L, 酵母エキス1g/L, ペプトン 7.5g/L, CoCl_2 0.01g/L, 尿素7.5g/L, グリシン1%又はアンピシリン 0.2μg/ml, 水1L, pH7.2) 100mlに植菌して培養後、集菌し、TNEで洗浄後、TE10mlに懸濁し、0.25M EDTA 4ml, リゾチーム10~20mg、アクロモプロテアーゼ10~20mg及び10×SDS 10mlを加え、37℃で3時間放置した。次にフェノールを15ml加え、室温で15分間放置し、遠心し、その上層を採った。そして2.5M酢酸ナトリウム溶液0.7ml、ジエチルエーテルを加え遠心し、その上層を捨て、下層に2容量のエタノールを加え、棒でDNAを巻き取った。これをTE:エタノール (容積比) の2:8, 1:9及び0:10の各溶液に5分間づつひたし、2~4mlのTE (37℃) に溶かし、37℃で RNase AとT₁の混合物を10μL加えた。次にフェノールを等量加え、遠心後その上層を採り、エーテルを等量以上加え、また遠心し上層を捨て、下層をクロロホルムを少量添加した2LのTEで一晩透析した。更に2回目の透析を3~4時間かけて行い、粗染色体DNA標品約4mlを得た。

【0016】次に、粗染色体DNA標品15μLに制限酵素 Sac I 2μL、該酵素用緩衝液 (10倍濃度) 3μL及びTE 10μLを加え37℃で1時間反応させた後、アガロースゲル電気泳動 (60V, 3時間) に供した。そして工程(2)で合成したDNAプローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果約 6.0Kbと 9.4Kbの位置に上記プローブが強くハイブリダイズするDNA断片があることが見出された。

【0017】そこで、粗染色体DNA標品15μLを前述と同様の方法で制限酵素 Sac I で切断した後、アガロースゲル電気泳動を行い、6.0Kbと 9.4KbのDNA断片を含むゲルを切り出した。これを、それぞれ3倍容量の8M NaCl₁₀溶液を加えて可溶化した後、6mm径のGF/C濾紙 (Whatman製) の上にDNAを吸着させ、次いで6M NaCl₁₀含有TE 100μLを10回、更に95%エタノール 100μLを10回滴下し、3分間風乾させた。そして、これを 0.5ml エッペンドルフのチューブに移しTE 40μLを添加し、47℃, 30分間放置した後、遠心してその上澄み約40μLを分取した。この溶液の中に目的のニトリルヒドラターゼ染色体DNAを含む 6.0Kb DNA断片と 9.4Kb DNA断片がそれぞれ回収されたことになる。

【0018】次の各工程の具体例は 6.0Kb DNA断片の例を述べるが、9.4Kb DNA断片の場合も同様である。

(4) 染色体DNA断片のベクターへの挿入:

プラスミド pUC19 10μLに対し、制限酵素 Sac I 2μL、該酵素用緩衝液 (10倍濃度) 3μL及びTE10μLを加え30℃で1時間反応させ、次に 0.25MEDTA 2μLを添加

して反応をとめ、更に1M Tris-HCl(pH 9)を7 μ L、BAP(細菌性アルカリホスファターゼ) 3 μ L加えて65℃で1時間反応させた。これに TE を加えて全体を 100 μ Lとし、等量のフェノールで3回抽出し、これにエーテルを等量加えて、下層を採り、これに3M酢酸ナトリウム溶液10 μ Lとエタノール 250 μ Lを加え、-80℃で30分放置後遠心し、乾燥してTEに溶解した。

【0019】この様に Sac I で切断し、BAP 処理した pUC19 5 μ Lと工程(3)で回収した 6.0Kb DNA断片溶液 40 μ Lを混合し、連結緩衝液 6 μ L、6mg/ml ATP溶液 6 μ L及びT4-DNAリガーゼ 3 μ Lとを加え、4℃で一夜(12時間)反応させることによって目的遺伝子を含む 6.0Kb DNA断片を pUC19に挿入した組換え体プラスミド約60 μ Lを作製してDNAライブラリーとした。

(5) 形質転換体の作製及び組換え体DNAの選別:

E. coli TG1株(Amersham社製)を2xYT培地10mlに37℃で接種して12時間培養後、それを新規な2xYT培地に1%接種し、37℃で2時間培養した。そして遠心集菌後、冷 50mM CaCl₂ 溶液を 5ml加え、0℃で40分放置後、再度遠心して、冷 50mM CaCl₂ 溶液0.25ml及び工程(4)で調製した組換え体プラスミドを含む溶液60 μ Lを加え、0℃で40分放置後、42℃で2分間ヒートショックを与え0℃で5分放置して、2xYT培地10mlを加え、37℃で90分間振とう培養した後、遠心集菌した。これに2xYT培地 1ml添加し菌体を充分懸濁させた後、その懸濁液を10 μ Lずつアンピシリン50 μ g/ml含有2xYT培地寒天2プレートに分注し、37℃で培養した。そして、プレート上に生育した形質転換体コロニーをコロニーハイブリダイゼーション法にてニトリルヒドラターゼ遺伝子を持つ形質転換体を選抜した。すなわちプレート中に培養した形質転換体をニトロセルロースフィルター上に移し、菌体を溶かしてDNAを固定した後、これを工程(2)作製のプローブで処理し、オートラジオグラフ法で目的の組換え体DNAを含むコロニーを選抜した。更に、この選抜したコロニーから組換え体プラスミドを抽出し、サザンハイブリダイゼーションによって上述のプローブとハイブリダイズさせ、選抜したコロニーが目的遺伝子を含む形質転換体であることを再確認した。

(6) 組換え体プラスミドの精製と制限酵素地図の作成:

工程(5)で選抜した形質転換体を2xYT (50 μ g/mlアンピシリン含有)培地 100mlに接種し、37℃で一夜(12時間)培養後、集菌し、TNEを加え再度集菌し、STEを8ml、リゾチムを10mg加え、0℃で5分間反応させ、0.25M EDTA 4ml加えて、更に室温で10% SDS 2ml、5M NaCl 5mlを加え、0~4℃で3時間放置した。それを超遠心し、その上澄みに30%のPEG6000を1/2当量加え、0~4℃で一夜(12時間)放置し、再度遠心した後TNEに溶解して7.5mlとし、CsClを加えて遠心して除蛋白後、臭化エチジウム溶液を 300~500mg/ml加えシールチューブ

に移し、熱シールし超遠心した。そして、ベリスタポンプで cccDNAを取り出し水飽和イソプロピルアルコールを等量以上加えて臭化エチジウムを除き、TEで透析し、精製した組換え体プラスミド約3mlを得た。これを pNHJ10Hと命名した。なお、9.4kb DNA断片の場合は pNHJ20Lと命名した。

【0020】この組換え体プラスミドを、制限酵素 EcoRI、BamHI、Pst I、Sac I 及び Sal I 等を用いて切断し、図1に示される制限酵素地図を作製した。

10 (7) 塩基配列の決定:

pNHJ10Hの親株由来のDNA断片のどの部分に目的遺伝子が位置しているかを工程(6)で作成した制限酵素地図とサザンハイブリダイゼーションによって決め、不要部分を制限酵素 Pst I と Sal I (pNHJ20Lの場合はEcoRIとSac I)にて切り縮め、6.0Kbの鎖長を1.97Kb (pNHJ20Lの場合は9.4Kbを1.73Kb)とした。そしてこの得られたDNA断片の全塩基配列をM13ファージベクターを用いたサンガー法 Sanger, F. Science 214, 1205-1210 (1981)により決定した。その結果、この親株由来のDNA断片の塩基配列は配列番号14(pNHJ20Lの場合は配列番号15)に示す通りであった。

【0021】なお、この塩基配列から予想されるアミノ酸配列は、工程(1)で決定したアミノ酸配列と完全に一致することが確認され、このDNA断片に α 、 β サブユニット遺伝子の両方が存在することが明らかとなった。

(8) 形質転換体を用いたニトリルヒドラターゼ生産とニトリル類のアミド類への変換:

TG1/pNHJ10H およびTG1/pNHJ20L 株をそれぞれ2xYT (50 μ g/mlアンピシリン含有)培地10mlに接種し30℃で一夜(12時間)培養し、この培養物を2xYT(50 μ g/mlアンピシリン、0.1g/l CoCl₂・6H₂O含有)培地10mlに1%宛接種し、30℃で4時間培養し、これに終濃度が1mMとなるようにIPTGを添加し、更に30℃で10時間培養した。集菌後、この菌体を0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.5) 5mlに懸濁し、5分間超音波処理により菌体を破碎後、遠心分離(12,000G 30分)した。得られた上清液、50mMリン酸カルシウム緩衝液(pH7.5) および6mMベンゾニトリルを含む混合液(12ml)を20℃、30分反応後、0.2ml 1MHC1を添加して反応を止めた。なお、対照試験として、上記形質転換体に代えて、E. coli TG1株のみを用いて同様に行った。反応終了後、反応液中の生成ベンズアミドを高速度液体クロマトグラフィーを用いて検出した。その結果、宿主E. coli TG1株ではベンズアミドが検出できなかったが、形質転換体TG1/pNHJ10H およびTG1/pNHJ20L 株では、それぞれ、 1.75×10^{-3} および 6.99×10^{-3} units/mgの酵素活性が認められた。

【0022】ここで、unitはベンゾニトリルからベンズアミドを1Mモル/分の速度で生成させる酵素活性として定義される。

50 【0023】

【発明の効果】本発明により、ロドコッカス ロドクロウス J-1 株の持つサブユニット α 及びサブユニット β のアミノ酸配列を有し、ニトリルヒトラターゼ活性を有する2種類のポリペプチドをコードするDNA配列が明らかにされた。そして、このDNAを含むプラスミドで形質転換された形質転換体が作出された。以上により、このニトリルヒトラターゼ遺伝子を菌体内に多コピー存在させ、菌体内酵素量を従来に比して飛躍的に増大させることができる。

【0024】

【配列表】

(vii) 配列:

```

      5           10           15
MetSerGluHisValAsnLysTyrThrGluTyrGluAlaArgThr
      20           25           30
LysAlaIleGluThrLeuLeuTyrGluArgGlyLeuIleThrPro
      35           40           45
AlaAlaValAspArgValValSerTyrTyrGluAsnGluIleGly
      50           55           60
ProMetGlyGlyAlaLysValValAlaLysSerTrpValAspPro
      65           70           75
GluTyrArgLysTrpLeuGluGluAspAlaThrAlaAlaMetAla
      80           85           90
SerLeuGlyTyrAlaGlyGluGlnAlaHisGlnIleSerAlaVal
      95          100          105
PheAsnAspSerGlnThrHisHisValValValCysThrLeuCys
     110          115          120
SerCysTyrProTrpProValLeuGlyLeuProProAlaTrpTyr
     125          130          135
LysSerMetGluTyrArgSerArgValValAlaAspProArgGly
     140          145          150
ValLeuLysArgAspPheGlyPheAspIleProAspGluValGlu
     155          160          165
ValArgValTrpAspSerSerSerGluIleArgTyrIleValIle
     170          175          180
ProGluArgProAlaGlyThrAspGlyTrpSerGluGluGluLeu
     185          190          195
ThrLysLeuValSerArgAspSerMetIleGlyValSerAsnAla
     200
LeuThrProGlnGluValIleVal

```

【0025】

(2) 配列番号: 2

(i) 配列の長さ: 229

(ii) 配列の型: アミノ酸

(iii) トポロジー: 直鎖状

(iv) 配列の種類: ペプチド

(vii) 配列:

```

      5           10           15
MetAspGlyIleHisAspThrGlyGlyMetThrGlyTyrGlyPro
      20           25           30

```

* (1) 配列番号: 1

(i) 配列の長さ: 203

(ii) 配列の型: アミノ酸

(iii) トポロジー: 直鎖状

(iv) 配列の種類: ペプチド

(v) 起源

(a) 生物名: ロドコッカス・ロドクロウス

(b) 株名: J-1 (FERM BP-1478)

(vi) 配列の特徴

10

* (a) 他の情報: $\alpha^{(H)}$ -サブユニット

(v) 起源

(a) 生物名: ロドコッカス・ロドクロウス

(b) 株名: J-1 (FERM BP-1478)

(vi) 配列の特徴

(a) 他の情報: $\beta^{(H)}$ -サブユニット

ValProTyrGlnLysAspGluProPhePheHisTyrGluTrpGlu
 35 40 45
 GlyArgThrLeuSerIleLeuThrTrpMetHisLeuLysGlyIle
 50 55 60
 SerTrpTrpAspLysSerArgPhePheArgGluSerMetGlyAsn
 65 70 75
 GluAsnTyrValAsnGluIleArgAsnSerTyrTyrThrHisTrp
 80 85 90
 LeuSerAlaAlaGluArgIleLeuValAlaAspLysIleIleThr
 95 100 105
 GluGluGluArgLysHisArgValGlnGluIleLeuGluGlyArg
 110 115 120
 TyrThrAspArgLysProSerArgLysPheAspProAlaGlnIle
 125 130 135
 GluLysAlaIleGluArgLeuHisGluProHisSerLeuAlaLeu
 140 145 150
 ProGlyAlaGluProSerPheSerLeuGlyAspLysIleLysVal
 155 160 165
 LysSerMetAsnProLeuGlyHisThrArgCysProLysTyrVal
 170 175 180
 ArgAsnLysIleGlyGluIleValAlaTyrHisGlyCysGlnIle
 185 190 195
 TyrProGluSerSerSerAlaGlyLeuGlyAspAspProArgPro
 200 205 210
 LeuTyrThrValAlaPheSerAlaGlnGluLeuTrpGlyAspAsp
 215 220 225
 GlyAsnGlyLysAspValValCysValAspLeuTrpGluProTyr
 LeuIleSerAla

【0026】

(3) 配列番号: 3

(i) 配列の長さ: 207

(ii) 配列の型: アミノ酸

(iii) トポロジー: 直鎖状

(iv) 配列の種類: ペプチド

(vii) 配列:

5 10 15
 MetThrAlaHisAsnProValGlnGlyThrLeuProArgSerAsn
 20 25 30
 GluGluIleAlaAlaArgValLysAlaMetGluAlaIleLeuVal
 35 40 45
 AspLysGlyLeuIleSerThrAspAlaIleAspHisMetSerSer
 50 55 60
 ValTyrGluAsnGluValGlyProGlnLeuGlyAlaLysIleVal
 65 70 75
 AlaArgAlaTrpValAspProGluPheLysGlnArgLeuLeuThr
 80 85 90
 AspAlaThrSerAlaCysArgGluMetGlyValGlyGlyMetGln
 95 100 105
 GlyGluGluMetValValLeuGluAsnThrGlyThrValHisAsn

30 (v) 起源

(a) 生物名: ロドコッカス・ロドクロウス

(b) 株名: J-1 (FERM BP-1478)

(vi) 配列の特徴

(a) 他の情報: $\alpha^{(1)}$ -サブユニット


```

110      115      120
MetValValCysThrLeuCysSerCysTyrProTrpProValLeu
125      130      135
GlyLeuProProAsnTrpTyrLysTyrProAlaTyrArgAlaArg
140      145      150
AlaValArgAspProArgGlyValLeuAlaGluPheGlyTyrThr
155      160      165
ProAspProAspValGluIleArgIleTrpAspSerSerAlaGlu
170      175      180
LeuArgTyrTrpValLeuProGlnArgProAlaGlyThrGluAsn
185      190      195
PheThrGluGluGlnLeuAlaAspLeuValThrArgAspSerLeu
200      205
IleGlyValSerValProThrThrProSerLysAla

```

【0027】

(4) 配列番号: 4

(i) 配列の長さ: 226

(ii) 配列の型: アミノ酸

(iii) トポロジー: 直鎖状

(iv) 配列の種類: ペプチド

(v) 起源

(a) 生物名: ロドコッカス・ロドクロウス

(b) 株名: J-1 (FERM BP-1478)

(vi) 配列の特徴

(a) 他の情報: β -サブユニット

20

(vii) 配列:

```

5      10      15
MetAspGlyIleHisAspLeuGlyGlyArgAlaGlyLeuGlyPro
20      25      30
IleLysProGluSerAspGluProValPheHisSerAspTrpGlu
35      40      45
ArgSerValLeuThrMetPheProAlaMetAlaLeuAlaGlyAla
50      55      60
PheAsnLeuAspGlnPheArgGlyAlaMetGluGlnIleProPro
65      70      75
HisAspTyrLeuThrSerGlnTyrTyrGluHisTrpMetHisAla
80      85      90
MetIleHisHisGlyIleGluAlaGlyIlePheAspSerAspGlu
95      100     105
LeuAspArgArgThrGlnTyrTyrMetAspHisProAspAspThr
110     115     120
ThrProThrArgGlnAspProGlnLeuValGluThrIleSerGln
125     130     135
LeuIleThrHisGlyAlaAspTyrArgArgProThrAspThrGlu
140     145     150
AlaAlaPheAlaValGlyAspLysValIleValArgSerAspAla
155     160     165
SerProAsnThrHisThrArgArgAlaGlyTyrValArgGlyArg
170     175     180
ValGlyGluValValAlaThrHisGlyAlaTyrValPheProAsp
185     190     195
ThrAsnAlaLeuGlyAlaGlyGluSerProGlnHisLeuTyrThr
200     205     210
ValArgPheSerAlaThrGluLeuTrpGlyGluProAlaAlaPro
215     220     225

```

AsnValValAsnHisIleAspValPheGluProTyrLeuLeuPro

Ala

【0028】

(5) 配列番号: 5

(i) 配列の長さ: 609

(ii) 配列の型: 核酸

(iii) 鎖の数: 一本鎖

(iv) トポロジー: 直鎖状

* (v) 配列の種類: Genomic DNA

(iv) 起源

(a) 生物名: ロドコッカス・ロドクロウス

(b) 株名: J-1 (FERM BP-1478)

(vii) 配列の特徴

* (a) 他の情報: $\alpha^{(H)}$ -サブユニット

(viii) 配列:

```

15          30          45
GTGAGCGAGCACGTCAATAAGTACACGGAGTACGAGGCACGTACC
60          75          90
AAGCGGATCGAAACCTTGCTGTACGAGCGAGGGCTCATCAGCCCC
105         120         135
GCCGCGGTGACCGAGTCGTTTCGTACTACGAGAACGAGATCGGC
150         165         180
CCGATGGGCGGTGCCAAGGTCGTGGCCAAGTCCTGGGTGGACCT
195         210         225
GAGTACCGCAAGTGGCTCGAAGAGGACGCGACGGCCGGATGGCG
240         255         270
TCATTGGGCTATGCCGGTGAGCAGGCACACCAAATTCGGCGGTC
285         300         315
TTCAACGACTCCCAAACGCATCAGTGGTGGTGTGCACTCTGTGT
330         345         360
TCGTGCTATCCGTGGCCGGTGCTTGGTCTCCCGCCCGCCTGGTAC
375         390         405
AAGAGCATGGAGTACCGGTCCCGAGTGGTAGCGGACCCTCGTGA
420         435         450
GTGCTCAAGCGGATTTGGGTTTCGACATCCCGATGAGGTGGAG
465         480         495
GTCAGGGTTTGGGACAGCAGCTCCGAAATCCGCTACATCGTCATC
510         525         540
CCGGAACGGCCGGCCGGCACCAGCGTGGTCCGAGGAGGAGCTG
555         570         585
ACGAAGCTGGTGAGCCGGGACTCGATGATCGGTGTCAGTAATGCG
600
CTCACACCGCAGGAAGTGATCGTA

```

【0029】

(6) 配列番号: 6

(i) 配列の長さ: 687

(ii) 配列の型: 核酸

(iii) 鎖の数: 一本鎖

(iv) トポロジー: 直鎖状

(v) 配列の種類: Genomic DNA

(vi) 起源

(a) 生物名: ロドコッカス・ロドクロウス

(b) 株名: J-1 (FERM BP-1478)

(vii) 配列の特徴

(a) 他の情報: $\beta^{(H)}$ -サブユニット

(viii) 配列:

```

15          30          45
ATGGATGGTATCCACGACACAGCGGCATGACCGGATACGGACCG
60          75          90
GTCCCTATCAGAAGGACGAGCCCTTCTTCCACTACGAGTGGGAG

```

```

105      120      135
GGTCGGACCCGTGCAATTCTGACTTGGATGCATCTCAAGGGCATA
150      165      180
TCGTGGTGGGACAAGTCGCGGTTCTTCCGGGAGTCGATGGGGAAC
195      210      225
GAAAACTACGTCAACGAGATTGCGAACTCGTACTACACCCACTGG
240      255      270
CTGAGTGGCGCAGAACGTATCCTCGTCGCCGACAAGATCATCACC
285      300      315
GAAGAAGAGCGAAAGCACCGTGTGCAAGAGATCCTTGAGGGTCGG
330      345      360
TACACGGACAGGAAGCCGTGCGGGAAGTTCGATCCGGCCCAGATC
375      390      405
GAGAAGGCGATCGAACGGCTTCAGAGCCCCACTCCCTAGCGCTT
420      435      450
CCAGGAGCGGAGCCGAGTTTCTCTCGGTGACAAGATCAAAGTG
465      480      495
AAGAGTATGAACCCGCTGGGACACACACGGTGCCCGAAATATGTG
510      525      540
CGGAACAAGATCGGGGAAATCGTCGCCTACACGGCTGCCAGATC
555      570      585
TATCCCGAGAGCAGCTCCGCGGCCCTCGGCGACGATCCTCGCCCG
600      615      630
CTCTACACGGTCGCGTTTTCCGCCCAGGAAGTGTGGGGCGACGAC
645      660      675
GGAAACGGGAAAGACGTAGTGTGCGTCGATCTCTGGGAACCGTAC
CTGATCTCTGCG

```

【0030】

(7) 配列番号: 7

(i) 配列の長さ: 621

(ii) 配列の型: 核酸

(iii) 鎖の数: 一本鎖

(iv) トポロジー: 直鎖状

(v) 配列の種類: Genomic DNA

(viii) 配列:

(vi) 起源

30

(a) 生物名: ロドコッカス・ロドクロウス

(b) 株名: J-1 (FERM BP-1478)

(vii) 配列の特徴

(a) 他の情報: $\alpha^{(L)}$ -サブユニット

```

15      30      45
ATGACCGCCCAATCCCGTCCAGGGCACGTTGCCACGATCGAAC
60      75      90
GAGGAGATCGCCGCACGCGTGAAGGCCATGGAGGCCATCCTCGTC
105     120     135
GACAAGGGCCTGATCTCCACCGACGCCATCGACCACATGTCCTCG
150     165     180
GTCTACGAGAACGAGGTGCGTCTCAACTCGGCGCCAAGATCGTC
195     210     225
GCCCCGCGCTGGGTGATCCCGAGTTCAAGCAGCGCCTGCTCACC
240     255     270
GACGCCACCAGCGCCTGCCGTGAAATGGGCGTCGGCGGCATGCAG
285     300     315
GGCGAAGAAATGGTCTGCTGGAACACCGGCACGGTCCACAAC

```

```

      330      345      360
ATGGTCGTATGTACCTTGTGCTCGTGTATCCGTGGCCGGTTCTC
      375      390      405
GGCCTGCCACCCAACCTGGTACAAGTACCCCGCCTACCGCGCCCGC
      420      435      450
GCTGTCCGCGACCCCGAGGTGTGCTGGCCGAATTCGGATATACC
      465      480      495
CCCGACCCTGACGTGAGATCCGGATATGGGACTCGAGTGCCGAA
      510      525      540
CTTCGCTACTGGGTCTGCCGCAACGCCAGCCGGCACCGAGAAC
      555      570      585
TTCACCGAAGAACAACCTGCCGACCTCGTCACCCGCGACTCGCTC
      600      615
ATCGGCGTATCCGTCCCCACCACCCAGCAAGGCC

```

【0031】

(vi) 起源

(8) 配列番号: 8

(i) 配列の長さ: 678

(a) 生物名: ロドコッカス・ロドクロウス

(ii) 配列の型: 核酸

(b) 株名: J-1 (FERM BP-1478)

(iii) 鎖の数: 一本鎖

(vii) 配列の特徴

(iv) トポロジー: 直鎖状

20 (a) 他の情報: $\beta^{(1)}$ -サブユニット

(v) 配列の種類: Genomic DNA

(viii) 配列:

```

      15      30      45
ATGGATGGAATCCACGACCTCGGTGGCCGCGCCGGCCTGGGTCCG
      60      75      90
ATCAAGCCCGAATCCGATGAACCTGTTTTCCATTCCGATTGGGAG
      105      120      135
CGGTGGTTTTGACGATGTTCCCGCGGATGGCGTGGCCGCGCGG
      150      165      180
TTCAATCTCGACCACTTCGGGGCGCGATGGAGCAGATCCCCCG
      195      210      225
CACGACTACCTGACCTCGCAATACTACGAGCACTGGATGCACGCG
      240      255      270
ATGATCCACCACGGCATCGAGGCGGCATCTTCGATTCCGACGAA
      285      300      315
CTCGACCGCCGCACCCAGTACTACATGGACCATCCGGACGACACG
      330      345      360
ACCCCCACGCGGCAGGATCCGCAACTGGTGGAGACGATCTCGCAA
      375      390      405
CTGATCACCACGGAGCCGATTACCGACGCCCGACCGACACCGAG
      420      435      450
GCCGCATTGCGCGTAGGCGACAAAGTCATCGTGGGTGGGACGCC
      465      480      495
TCACCGAACACCCACACCCGCGCGCGGATACGTCCGCGGTCTGT
      510      525      540
GTCGGCGAAGTCGTGGCGACCCACGGCGGTATGTCTTCCGGAC
      555      570      585
ACCAACGCACTCGGCGCGCGGAAAGCCCCGAACACCTGTACACC
      600      615      630
GTGCGGTTCTCGGCGACCGAGTTGTGGGTGAACCTGCCGCCCCG

```

645 660 675
AACGTCGTCAATCACATGACGTGTTGGAACCGTATCTGCTACCG

GCC

【0032】

- (9) 配列番号: 9
(i) 配列の長さ: 26
(ii) 配列の型: アミノ酸
(iii) トポロジー: 直鎖状
(iv) 配列の種類: ペプチド

* (v) 起源

- (a) 生物名: ロドコッカス・ロドクロウス
(b) 株名: J-1 (FERM BP-1478)
(vi) 配列の特徴
(a) 他の情報: $\alpha^{(H)}$ -サブユニット: $\alpha_1^{(2)}$

* 10

(vii) 配列:

5 10 15
Ser-Glu-His-Val-Asn-Lys-Tyr-Thr-Glu-Tyr-Glu-Ala-Arg-Thr-Lys
20 25
Ala-Ile-Glu-Thr-Leu-Leu-Tyr-Glu-Arg-Gly-Leu

【0033】

- (10) 配列番号: 10
(i) 配列の長さ: 28
(ii) 配列の型: アミノ酸
(iii) トポロジー: 直鎖状
(iv) 配列の種類: ペプチド

※ (v) 起源

- (a) 生物名: ロドコッカス・ロドクロウス
(b) 株名: J-1 (FERM BP-1478)
(vi) 配列の特徴
20 ※ (a) 他の情報: $\beta^{(H)}$ -サブユニット: $\beta_1^{(3)}$

(vii) 配列:

5 10 15
Met-Asp-Gly-Ile-His-Asp-Thr-Gly-Gly-Met-Thr-Gly-Tyr-Gly-Pro
20 25
Val-Pro-Tyr-Gln-Lys-Asp-Glu-Pro-Phe-Phe-His-Tyr-Glu

【0034】

- (11) 配列番号: 11
(i) 配列の長さ: 15
(ii) 配列の型: アミノ酸
(iii) トポロジー: 直鎖状
(iv) 配列の種類: ペプチド

★ (v) 起源

- (a) 生物名: ロドコッカス・ロドクロウス
30 (b) 株名: J-1 (FERM BP-1478)
(vi) 配列の特徴
★ (a) 他の情報: $\alpha^{(L)}$ -サブユニット: $\alpha_1^{(2)}$

(vii) 配列:

5 10 15
Thr-Ala-His-Asn-Pro-Val-Gln-Gly-Thr-Leu-Pro-Arg-?-Asn-Glu

【0035】

- (12) 配列番号: 12
(i) 配列の長さ: 19
(ii) 配列の型: アミノ酸
(iii) トポロジー: 直鎖状
(iv) 配列の種類: ペプチド

☆ (v) 起源

- (a) 生物名: ロドコッカス・ロドクロウス
(b) 株名: J-1 (FERM BP-1478)
40 (vi) 配列の特徴
☆ (a) 他の情報: $\beta^{(L)}$ -サブユニット: $\beta_1^{(2)}$

(vii) 配列:

5 10 15
Met-Asp-Gly-Ile-His-Asp-Leu-Gly-Gly-Arg-Ala-?-Leu-?-Pro

Ile-Lys-Pro-Glu

【0036】

- (13) 配列番号: 13
(i) 配列の長さ: 2070
(ii) 配列の型: 核酸

- (iii) 鎖の数: 一本鎖
(iv) トポロジー: 直鎖状
(v) 配列の種類: Genomic DNA
50 (vi) 起源

23

24

- (a) 生物名: ロドコッカス sp
 (b) 株名: N-774 (FERM BP-1936)
 (vii) 配列の特徴

No.675~1295: サブユニット α
 No.1225 ~1960: サブユニット β

(viii) 配列:

SphI
 GCATGCTTCCACATCTGGAACGTGATCGCCACGGACGGTGGTG
 50
 CCTACCAGATGTTGGACGGCAACGGATACGGCATGAACGCCGAAG
 100
 GTTTGTACGATCCGGAAGTATGGCACACTTTGCTTCTCGACGCA
 150
 TTCAGCACGCCGACGCTCTGTCCGAAACCGTCAAACCTGGTGGCCC
 200
 TGACCGGCCACCAACGGCATCACACCCCTCGGCGGCGGAGCTACG
 250
 GCAAAGCCCGGAACCTCGTACCGCTTGCCCGCGCCGCTACGACA
 300
 CTGCCTTGAGACAATTCGACGTCTGGTGATGCCAACGCTGCCCT
 350
 ACGTCGCATCCGAATTGCCGGCGAAGGACGTAGATCGTGCAACCT
 400
 TCATACCAAGGCTCTCGGGATGATCGCCAACACGGCACCAATTCG
 ACGTGACCGGACATCCGTCCCTGTCCGTTCCGGCCGGCCTGGTGA
 450
 ACGGGGTTCCGGTCGGAATGATGATCACCGGCAGACACTTCGACG
 500
 HindIII
 ATGCGACAGTCCTTCGTGTGGACGCGCATTCGAAAAGCTTCGCG
 550
 GCGGTTTCCGACGCGCGCGAAGCGGCTCCAACCTGACACCAC
 600
 AACTCAGCCCGCCTAGTCCTGACGCACTGTCAGACAACAAATTC
 650
 CACCGATTACACATGATCAGCCACATAAGAAAAGGTGAACCAG
 700
 ATGTCAGTAACGATCGACCACACAACGGAGAACGCCGACCGGCC
 MetSerValThrIleAspHisThrThrGluAsnAlaAlaProAla
 Subunit α 750
 CAGCGCGGCTCTCCGACCGGCGTGGGCACTGTTCCGCGCACTC
 GlnAlaAlaValSerAspArgAlaTrpAlaLeuPheArgAlaLeu
 Kpn I 800
 GACGGTAAGGGATTGGTACCGACGGTTACGTCGAGGGATGGAAG
 AspGlyLysGlyLeuValProAspGlyTyrValGluGlyTrpLys
 850
 AAGACCTCCGAGGAGACTTCAGTCCAAGCGCGGAGCGGAATTC
 LysThrSerGluGluAspPheSerProArgArgGlyAlaGluLeu
 PvuII
 GTAGCGCGCATGGACCGACCCGAGTTCCGGCAGCTGCTTCTC
 ValAlaArgAlaTrpThrAspProGluPheArgGlnLeuLeuLeu
 900 Kpn I

25

26

ACCGACGGTACCGCCGAGTTGCCAGTACGGATACCTGGGCCCC
ThrAspGlyThrAlaAlaValAlaGlnTyrGlyTyrLeuGlyPro

. 950

CAGCGGGCTACATCGTGGCAGTCGAAGACACCCGACACTCAAG
GlnAlaAlaTyrIleValAlaValGluAspThrProThrLeuLys

. 1000

AACGTGATCGTGTGCTCGTGTTCATGCACCGGTGGCCCATC
AsnValIleValCysSerLeuCysSerCysThrAlaTrpProIle

. 1050

CTCGGTCTGCCACCCACCTGGTACAAGAGCTTGAATACCGTGG
LeuGlyLeuProProThrTrpTyrLysSerPheGluTyrArgAla

. 1100

CGCGTGGTCCGGAACCACGAAGGTTCTCTCCGAGATGGGAACC
ArgValValArgGluProArgLysValLeuSerGluMetGlyThr

. 1150

GAGATCGGTCCGACATCGAGATTCGGTCTACGACACCACCGCC
GluIleAlaSerAspIleGluIleArgValTyrAspThrThrAla

. 1200

GAAACTCGCTACATGGTCTCCCGCAGCGTCCCGCCGGCACC
GluThrArgTyrMetValLeuProGlnArgProAlaGlyThrGlu

Pst I

. 1250

GGCTGGAGCCAGGAACAACCTGCAGGAAATCGTCACCAAGGACTGC
GlyTrpSerGlnGluGlnLeuGlnGluIleValThrLysAspCys

. 1300

CTGATCGGGTTGCAATCCCGCAGGTTCCACCGTCTGATACCC
LeuIleGlyValAlaIleProGlnValProThrValTRM

CGACAAGAAGGAAGCACACC-ATGGATGGAGTACAGATCTTGCC
MetAspGlyValHisAspLeuAla
Subunit β

. 1350

GGAGTACAAGGCTTCGGCAAAGTCCCGCATACCGTCAACGCCGAC
GlyValGlnGlyPheGlyLysValProHisThrValAsnAlaAsp

. 1400

ATCGGCCCCACCTTTACGCCGAATGGGAACACCTGCCCTACAGC
IleGlyProThrPheHisAlaGluTrpGluHisLeuProTyrSer

. 1450

Sal I

CTGATGTTCCCGGTGTCCCGAACTCGGGGCCTTCAGCGTCGAC
LeuMetPheAlaGlyValAlaGluLeuGlyAlaPheSerValAsp

. 1500

GAAGTGCGATACGTCTGTCGAGCGGATGGAGCCGGGCCACTACATG
GluValArgTyrValValGluArgMetGluProGlyHisTyrMet

. 1550

ATGACCCCGTACTACGAGAGGTACGTATCGGTGTCCGACATTG
MetThrProTyrTyrGluArgTyrValIleGlyValAlaThrLeu

. 1600

ATGGTCGAAAAGGAATCCTGACGCAGGACGAACTCGAAAGCCTT
MetValGluLysGlyIleLeuThrGlnAspGluLeuGluSerLeu

. 1650

CGCGGGGACCGTTCCCACTGTACGGCCAGCGAATCCGAAGGG

AlaGlyGlyProPheProLeuSerArgProSerGluSerGluGly

. 1700

CGGCCGGCACCCGTCGAGACGACCACCTTCGAAGTCGGGCAGCGA
ArgProAlaProValGluThrThrThrPheGluValGlyGlnArg

. 1750

GTACGGTACGCGACGAGTACGTTCCGGGGCATATTCGAATGCCT
ValArgValArgAspGluTyrValProGlyHisIleArgMetPro

GCATACTGCCGTGGACGAGTGGGAACCATCTCTCATCGAACTACC
AlaTyrCysArgGlyArgValGlyThrIleSerHisArgThrThr

. 1800

GAGAAGTGGCCGTTTCCCGACGCAATCGGCCACGGGCGCAACGAC
GluLysTrpProPheProAspAlaIleGlyHisGlyArgAsnAsp

. 1850

GCCGGCGAAGAACCACGTACACGTGAAGTTCGCCGCCGAGGAA
AlaGlyGluGluProThrTyrHisValLysPheAlaAlaGluGlu

. 1900

Sal I

TTGTTCCGTAGCGACACCGACGGTGAAGCGTCGTTGTCGACCTC
LeuPheGlySerAspThrAspGlyGlySerValValValAspLeu

. 1950

TTCGAGGGTTACCTCGAGCCTCGGCCTGATCTTCCAGCATTCCA
PheGluGlyTyrLeuGluProAlaAlaTRM

. 2000

GGCGCGGGTCACGCGATCACAGCGTTTCGTGCGACCGCCGCTGA

. 2050

TCACCACGATTCATCTATCGGAAGGACACTGGAAATCATGGTCG
Sal I

[0037]

(14) 配列番号: 14

(i) 配列の長さ: 1970

(ii) 配列の型: 核酸

(iii) 鎖の数: 一本鎖

(iv) トポロジー: 直鎖状

(v) 配列の種類: Genomic DNA

(viii) 配列:

(vi) 起源

(a) 生物名: ロドコッカス・ロドクロウス

30 (b) 株名: J-1 (FERM BP-1478)

(vii) 配列の特徴

No. 408~1094: サブユニット $\beta^{(H)}$

No. 1111 ~1719: サブユニット $\alpha^{(H)}$

10 20 30 40 50 60 CT
GCAGCTCGAACATCGAAGGGTCCGAGCCGAGAGATCGGAGACGACACCCGGAGGG
70 80 90 100 110 120
AACTTAGCCTCCCGACCGATGCGTGTCTGGCAACGCCCTCAAATTCAGTGCAAGCGAT
130 140 150 160 170 180
TCAATCTTGTTACTTCCAGAACCGAATCACGTCCCGTAGTGTGCGGGGAGAGCGCCCGA
190 200 210 220 230 240
ACGCAGGGATGGTATCCATGCCGCCCTTCTCTTTTGAACGAGAACCGCCGGTACAGCC
250 260 270 280 290 300
GACCCGGAGACACTGTGACGCCGTTCAACGATTGTTGTGCTGTGAAGGATTCACCCAAGC

29

30

310 320 330 340 350 360
CAACTGATATCGCCATTCCGTTGCCGGAACATTGACACCTTCTCCCTACGAGTAGAAGC

370 380 390 400 410 420
CAGCTGGACCCCTCTTTGAGCCAGCTCCGATGAAAGGAATGAGGAAATGGATGGTATCC
MetAspGlyIleH
Subunit β (H)

430 440 450 460 470 480
ACGACACAGGCGGCATGACCGGATACGGACCGGTCCCCTATCAGAAGGACGAGCCCTTCT
isAspThrGlyGlyMetThrGlyTyrGlyProValProTyrGlnLysAspGluProPheP

490 500 510 520 530 540
TCCACTACGAGTGGGAGGGTCGGACCCGTCAATTCTGACTTGGATGCATCTCAAGGGCA
heHisTyrGluTrpGluGlyArgThrLeuSerIleLeuThrTrpMetHisLeuLysGlyI

550 560 570 580 590 600
TATCGTGGTGGGACAAGTCGCGGTTCTTCCGGGAGTCGATGGGGAACGAAACTACGTCA
leSerTrpTrpAspLysSerArgPhePheArgGluSerMetGlyAsnGluAsnTyrValA

610 620 630 640 650 660
ACGAGATTGCAACTCGTACTACCCACTGGCTGAGTGCAGGAGGAGGATCTCTCTCGTCG
snGluIleArgAsnSerTyrTyrThrHisTrpLeuSerAlaAlaGluArgIleLeuValA

670 680 690 700 710 720
CCGACAAGATCATCCGAAGAAGACGAAAGCACCGTGTGCAAGAGATCCTTGAGGGTC
laAspLysIleIleThrGluGluGluArgLysHisArgValGlnGluIleLeuGluGlyA

730 740 750 760 770 780
GGTACACGGACAGGAAGCCGTCGCGGAAGTTCGATCCGGCCAGATCGAGAAGGCGATCG
rgTyrThrAspArgLysProSerArgLysPheAspProAlaGlnIleGluLysAlaIleG

790 800 810 820 830 840
AACGGCTTCACGAGCCCACTCCCTAGCGCTTCCAGGAGCGGAGCCGAGTTCTCTCTCG
luArgLeuHisGluProHisSerLeuAlaLeuProGlyAlaGluProSerPheSerLeuG

850 860 870 880 890 900
GTGACAAGATCAAAGTGAAGAGTATGAACCCGCTGGGACACACCGGTGCCCGAAATATG
lyAspLysIleLysValLysSerMetAsnProLeuGlyHisThrArgCysProLysTyrV

910 920 930 940 950 960
TGCGGAACAAGATCGGGAAATCGTCGCCTACCACGGCTGCCAGATCTATCCGAGAGCA
alArgAsnLysIleGlyGluIleValAlaTyrHisGlyCysGlnIleTyrProGluSerS

970 980 990 1000 1010 1020
GCTCCGCCGCGCTCGGCGACGATCCTCGCCCGCTCTACACGGTCGCGTTTCCGCCAGG
erSerAlaGlyLeuGlyAspAspProArgProLeuTyrThrValAlaPheSerAlaGlnG

1030 1040 1050 1060 1070 1080
AACTGTGGGCGACGACGGAACGGGAAAGACGTAGTGTGCGTCGATCTCTGGGAACCGT
luLeuTrpGlyAspAspGlyAsnGlyLysAspValValCysValAspLeuTrpGluProT

1090 1100 1110 1120 1130 1140
ACCTGATCTCTGCGTGAAAGGAATACGATAGTGAGCGAGCACGTCAATAAGTACACGGAG
yrLeuIleSerAla
MetSerGluHisValAsnLysTyrThrGlu
Subunit α (H)

1150 1160 1170 1180 1190 1200
TACGAGCCACGTACCAAGCGGATCGAAACCTTGCTGTACGAGCGAGGCTCATCACGCC
TyrGluAlaArgThrLysAlaIleGluThrLeuLeuTyrGluArgGlyLeuIleThrPro

1210 1220 1230 1240 1250 1260
GCCGCGGTGACCGAGTCGTTTCGTACTACGAGAACGAGATCGGCCGATGGGCGGTGCC
AlaAlaValAspArgValValSerTyrTyrGluAsnGluIleGlyProMetGlyGlyAla

31

32

1270 1280 1290 1300 1310 1320
 AAGGTCGTGGCCAAGTCCTGGGTGGACCTGAGTACCGCAAGTGGCTCGAAGAGGACGCG
 LysValValAlaLysSerTrpValAspProGluTyrArgLysTrpLeuGluGluAspAla
 1330 1340 1350 1360 1370 1380
 ACGCCCGCATGGCGTCATTGGGCTATGCCGGTGAGCAGGCACACCAAATTCGGCGGTC
 ThrAlaAlaMetAlaSerLeuGlyTyrAlaGlyGluGlnAlaHisGlnIleSerAlaVal
 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 TTCAACGACTCCCAACGCATCAOGTGGTGGTGTGCACTCTGTGTTCTGCTATCCGTGG
 PheAsnAspSerGlnThrHisHisValValValCysThrLeuCysSerCysTyrProTrp
 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 CCGGTGCTTGGTCTCCCGCCCGCTGGTACAAGAGCATGGAGTACCGGTCCCGAGTGGTA
 ProValLeuGlyLeuProProAlaTrpTyrLysSerMetGluTyrArgSerArgValVal
 1510 1520 1530 1540 1550 1560
 GCGGACCTCGTGGAGTCTCAAGCGCGATTTCGGTTTCGACATCCCGATGAGGTGGAG
 AlaAspProArgGlyValLeuLysArgAspPheGlyPheAspIleProAspGluValGlu
 1570 1580 1590 1600 1610 1620
 GTCAGGGTTTGGGACAGCAGCTCCGAAATCCGCTACATCGTCATCCCGGAACGGCCGGCC
 ValArgValTrpAspSerSerSerGluIleArgTyrIleValIleProGluArgProAla
 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 GGCACCGACGGTTGGTCCGAGGAGGAGCTGACGAAGCTGGTGAGCCGGGACTCGATGATC
 GlyThrAspGlyTrpSerGluGluGluLeuThrLysLeuValSerArgAspSerMetIle
 1690 1700 1710 1720 1730 1740
 GGTGTCAGTAATGCGCTCACACCGCAGGAAGTGATCGTATGAGTGAAGACACACTCACTG
 GlyValSerAsnAlaLeuThrProGlnGluValIleVal
 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 ATCGGCTCCCGGCGACTGGGACCGCGCACCGCCCCGCGACAATGGCGAGCTTGTATTCA
 1810 1820 1830 1840 1850 1860
 CCGAGCCTTGGGAAGCAACGGCATTCCGGGTGCGCATCGCGCTTTCGGATCAGAAGTCGT
 1870 1880 1890 1900 1910 1920
 ACGAATGGGAGTTCTTCCGACAGCGTCTCATTCACTCCATCGCTGAGGCCAACGGTTGGC
 1930 1940 1950 1960 1970
 AGGCATACTACGAGAGCTGGACAAAGGCGCTCGAGGCCAGCGTGGTTCGAC

【0038】

(15) 配列番号: 15

(i) 配列の長さ: 1731

(ii) 配列の型: 核酸

(iii) 鎖の数: 一本鎖

(iv) トポロジー: 直鎖状

(v) 配列の種類: Genomic DNA

(vi) 起源

(a) 生物名: ロドコッカス・ロドクロウス

(b) 株名: J-1 (FERM・BP)

(vii) 配列の特徴

40 No. 171~848 : サブユニット $\beta^{(1)}$ No. 915~1535 : サブユニット $\alpha^{(1)}$

(viii) 配列:

10 20 30 40 50 60
 GAGCTCCCTGGAGCCACTCGCGCGACGCATCCACGCTCGGACAGCCACGGTGGGATC
 70 80 90 100 110 120
 ACCCTGTTTCGTCGGTAACAGAACAGTAACATGTCATCAGGTGATGACGTGTTGACGCAT
 130 140 150 160 170 180
 TAGACGAGGGCACATAGGGTTGGTGAATCACGGCACAAGGAGAGCATTTTCATGGATGGAA

33

34

MetAspGlyI
Subunit $\beta^{(L)}$

190 200 210 220 230 240
TCCACGACCTCGGTGGCCGCGCCGGCTGGGTCCGATCAAGCCGAATCCGATGAACCTG
leHisAspLeuGlyGlyArgAlaGlyLeuGlyProIleLysProGluSerAspGluProV
250 260 270 280 290 300
TTTCCATTCCGATTGGGAGCGGTGGTGGTACGATGTTCCCGCGATGGCGCTGGCCG
alPheHisSerAspTrpGluArgSerValLeuThrMetPheProAlaMetAlaLeuAlaG
310 320 330 340 350 360
GCGCGTTCAATCTCGACCAGTTCGGGGCGCGATGGAGCAGATCCCCCGCACGACTACC
lyAlaPheAsnLeuAspGlnPheArgGlyAlaMetGluGlnIleProProHisAspTyrL
370 380 390 400 410 420
TGACCTCGCAATACTACGAGCACTGGATGCACGCGATGCCACCGCATCGAGGCGG
euThrSerGlnTyrTyrGluHisTrpMetHisAlaMetIleHisHisGlyIleGluAlaG
430 440 450 460 470 480
GCATCTTCGATTCCGACGAATCGACCGCCGACCCAGTACTACATGACCATCCGGACG
lyIlePheAspSerAspGluLeuAspArgArgThrGlnTyrTyrMetAspHisProAspA
490 500 510 520 530 540
ACACGACCCCGACGCGCAGGATCCGCAACTGGTGGAGACGATCTCGCAACTGATACCC
spThrThrProThrArgGlnAspProGlnLeuValGluThrIleSerGlnLeuIleThrH
550 560 570 580 590 600
ACCGAGCCGATTACCGACGCGCGACCGACACCGAGCGCGCATTCGCGTAGGCGACAAAG
isGlyAlaAspTyrArgArgProThrAspThrGluAlaAlaPheAlaValGlyAspLysV
610 620 630 640 650 660
TCATCGTCCGGTCGGACGCTCACCGAACACCCACACCGCGCGCGGATACGTCCGCG
alIleValArgSerAspAlaSerProAsnThrHisThrArgArgAlaGlyTyrValArgG
670 680 690 700 710 720
GTCGTGTCCGCGAAGTCGTGGCGACCCACGCGCGTATGTCTTCCGGACACCAACGCAC
lyArgValGlyGluValValAlaThrHisGlyAlaTyrValPheProAspThrAsnAlaL
730 740 750 760 770 780
TCGGCGCCGCGAAAGCCCGAACCTGTACACCGTCCGGTCTCGGCGACCGAGTTGT
euGlyAlaGlyGluSerProGluHisLeuTyrThrValArgPheSerAlaThrGluLeuT
790 800 810 820 830 840
GGGGTGAACCTGCCGCCCGAACGTCGTCATCACATCGACGTGTCGAACCGTATCTGC
rpGlyGluProAlaAlaProAsnValValAsnHisIleAspValPheGluProTyrLeuL
850 860 870 880 890 900
TACCGGCTGACCAGGTATCCGGTCCACCCAGCGAGACGTCCCTTACCACAGACAGAA
euProAla

910 920 930 940 950 960
ACGAGCCACCCCGATGACCGCCCAATCCCGTCCAGGGCACGTTGCCACGATCGAACG
MetThrAlaHisAsnProValGlnGlyThrLeuProArgSerAsnG
Subunit $\alpha^{(L)}$

970 980 990 1000 1010 1020
AGGAGATCGCCGACGCGTGAAGCCATGGAGGCCATCCTCGTCGACAAGGGCCTGATCT
luGluIleAlaAlaArgValLysAlaMetGluAlaIleLeuValAspLysGlyLeuIleS
1030 1040 1050 1060 1070 1080
CCACCGACGCCATCGACCACATGTCCTCGGTCTACGAGAAGAGGTCGGTCTCAACTCG
erThrAspAlaIleAspHisMetSerSerValTyrGluAsnGluValGlyProGlnLeuG
1090 1100 1110 1120 1130 1140
GCGCCAAGATCGTCGCCCGCGCTGGTTCGATCCCGAGTTCAAGCAGCGCTGCTCACCG

35

36

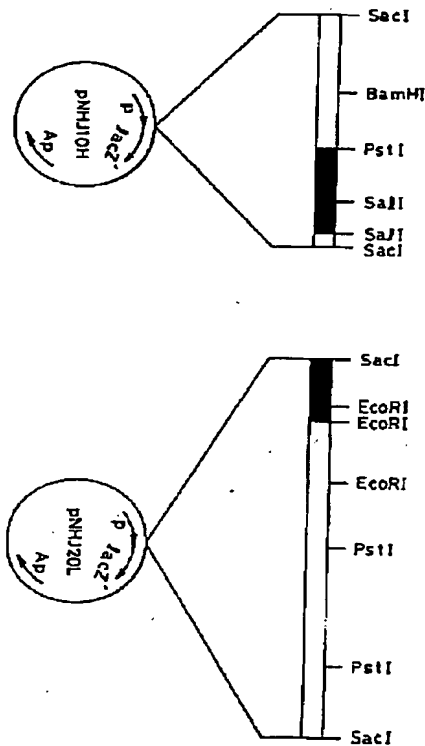
lyAlaLysIleValAlaArgAlaTrpValAspProGluPheLysGlnArgLeuLeuThrA
 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 ACGCCACCAGCGCCTGCCGTGAAATGGGCGTCGGCGGCATGCAGGGCGAAGAAATGGTCG
 spAlaThrSerAlaCysArgGluMetGlyValGlyGlyMetGlnGlyGluGluMetValV
 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 TGCTGGAACACCGGCACGGTCCACAACATGGTCGTATGTACCTTGTGCTCGTGCTATC
 alLeuGluAsnThrGlyThrValHisAsnMetValValCysThrLeuCysSerCysTyrP
 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 CGTGGCGGTTCTCGGCCTGCCAACCCTGGTACAAGTACCCCGCTACCGCGCCGCGG
 roTrpProValLeuGlyLeuProProAsnTrpTyrLysTyrProAlaTyrArgAlaArgA
 1330 1340 1350 1360 1370 1380
 CTGTCCGCGACCCCGAGGTGTGCTGGCGAATTCGGATATACCCCGACCTGACGTG
 laValArgAspProArgGlyValLeuAlaGluPheGlyTyrThrProAspProAspValG
 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 AGATCCGATATGGGACTCGAGTGCCGAACCTTCGCTACTGGGTCTGCCGAACGCCAG
 lulleArgIleTrpAspSerSerAlaGluLeuArgTyrTrpValLeuProGlnArgProA
 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 CCGGCACCGAGAATTACCGAAGAACAACCTCGCCGACCTCGTCACCCGCGACTCGCTCA
 laGlyThrGluAsnPheThrGluGluGlnLeuAlaAspLeuValThrArgAspSerLeuI
 1510 1520 1530 1540 1550 1560
 TCGGCGTATCCGTCCCCACCACCCAGCAAGGCCTGACATGCCCCGACTCAACGAACAA
 leGlyValSerValProThrThrProSerLysAla
 1570 1580 1590 1600 1610 1620
 CCCCACCCGGGTCTCGAAGCCAACCTCGGCGACCTGGTACAGAATCTGCCGTTCAACGAA
 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 CGAATCCCCCGCGCTCCGGCGAGGTCCGCTTCGATCAGGCCTGGGAGATCCGCGCCTTC
 1690 1700 1710 1720 1730
 AGCATTGCCACCGCATTGCATGGCCAGGCCGATTCCAATGGGACGAATTC

【図面の簡単な説明】

限酵素地図。

【図1】組換え体プラスミドpNHJ10H及びpNHJ20Lの制

【図1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁵	識別記号	片内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 R 1:01)				
(C 1 2 N 1/21				
C 1 2 R 1:19)				
(C 1 2 P 13/02				
C 1 2 R 1:19)				

(72)発明者 西山 真
東京都新宿区西落合二丁目16番11号

(72)発明者 長沢 透
京都府京都市左京区高野東開町1-7
(72)発明者 堀之内 末治
千葉県千葉市弥生町1-170